

# Siderophore vom Pyoverdin-Typ aus *Pseudomonas aeruginosa* [1]

Pyoverdine Type Siderophores from *Pseudomonas aeruginosa*

G. Briskot, K. Taraz und H. Budzikiewicz

Institut für Organische Chemie der Universität, Greinstraße 4, D-5000 Köln 41,  
Bundesrepublik Deutschland

Z. Naturforsch. **41c**, 497–506 (1986); received December 6, 1985

Siderophores, Pyoverdine, *Pseudomonas aeruginosa*

From *Pseudomonas aeruginosa* three siderophores belonging to the pyoverdine group have been isolated which differ only in the acid side chains bound to the quinoline chromophore.

Der von uns untersuchte Stamm von *Pseudomonas aeruginosa* gibt bei Wachstum unter Eisenmangelbedingungen gelbgrüne fluoreszierende Siderophore in das Kulturmedium ab, die in Form ihrer  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexe isoliert werden können. Als günstiger als die in der Literatur beschriebenen Extraktionsverfahren mit Phenol/CHCl<sub>3</sub> [2–5] bzw. Benzylalkohol [6, 7] erwies sich Adsorption an XAD-4 Kunstharsz und nachfolgendes Eluieren mit H<sub>2</sub>O/Aceton, was eine fast vollständige Abtrennung der H<sub>2</sub>O-löslichen Eisenkomplexe von lipophilen Verbindungen ermöglicht. Auftrennung erfolgt dann durch Ionenaustauschchromatographie und Gelchromatographie, wobei etwa zehn Komponenten erhalten werden. Die drei Hauptkomponenten – Ferri-Pyoverdin C, D und E –, die sich mit 8-Hydroxychinolin dekomplexieren lassen [5], wurden genauer untersucht. Die Reinheitskontrolle erfolgte durch HPLC an Nucleosil 5 C<sub>18</sub>.

## Charakterisierung von Pyoverdin C, D und E sowie der $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexe (Ferri-Pyoverdine)

Die rotbraunen  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexe von allen drei Verbindungen zeigen im Bereich von pH 3–7 ein Absorptionsmaximum bei 400 nm, während die freien Verbindungen bei pH 7 ein Maximum bei 400 und eine Schulter bei 385 nm aufweisen (s. Tab. I). Die Lage der Maxima und ihre pH-Abhängigkeit bei den freien Verbindungen entspricht den Literaturangaben für den für Pyoverdine und verwandte Verbindungen typischen Dihydroxychinolinchromophor [5].

Elektrophorese-Untersuchungen (s. Tab. I) zeigen, daß Ferri-Pyoverdin C im pH-Bereich 3,0–6,5 neutral und Ferri-E positiv geladen ist, wobei sich

Sonderdruckanforderungen an Prof. Dr. H. Budzikiewicz.  
Verlag der Zeitschrift für Naturforschung, D-7400 Tübingen  
0341–0382/86/0500–0497 \$ 01.30/0

Tab. I. Physikalische Daten der Pyoverdine C, D und E sowie ihrer  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexe.

Verbindung	log ε <sup>a</sup>	Elektrophorese bei pH <sup>b</sup>	m/z [M + H] <sup>+</sup> <sup>d</sup>
	1,9	3,0	6,5
C	4,33	0,68	0,19
D	4,32	0,70	0,42
E	4,28	0,71	0,54
$\text{Fe}^{3+}$ -C	4,15	– <sup>c</sup>	0,00
$\text{Fe}^{3+}$ -D	4,30	– <sup>c</sup>	0,34
$\text{Fe}^{3+}$ -E	4,26	– <sup>c</sup>	0,49
			0,00
			0,03
			0,48

<sup>a</sup>  $\lambda_{\text{max}}$  400 nm, pH 7, 0,1 N Acetat-Puffer.

<sup>b</sup> Elektrophoretische Mobilität relativ zu Desferal bezogen auf Glucose als Nullpunkt.

<sup>c</sup> Nicht aufgeführt, da es bereits zu teilweiser Protonierung der Koordinationsstellen kommt.

<sup>d</sup> Massenspektroskopisch (FAB) bestimmt. M entspricht der Molmasse der neutralen Moleküle.

die Mobilität nicht ändert. Ferri-D ist bei pH 6,5 neutral, bei pH 3 erreicht es fast die gleiche Mobilität wie Ferri-E. Dies läßt auf eine freie COOH-Gruppe mit  $\text{pK}_a$  zwischen 4 und 5 schließen. Die Mobilität der Ferri- ist kleiner als die der freien Verbindungen bedingt durch den Ersatz von 4H<sup>+</sup> durch  $\text{Fe}^{3+}$  bei der Komplexierung. C zeigt erst bei pH 1,9 die gleiche Mobilität wie D und E, was auf eine stark saure Carboxylgruppe ( $\text{pK}_a$  im Bereich 2–3) zurückzuführen wäre (vergl. unten). Die Ladungsgröße von Ferri-E wurde bei pH 6,5 nach der Methode von Offord [8] bestimmt. Relativ zu Asparaginsäure ergab sich eine Mobilität von 0,21 entsprechend einer Ladung von +1.

FAB-Massenspektren ergaben die in Tab. I aufgeführten [M + H]<sup>+</sup>-Ionen. Übergang der freien in die entsprechenden Ferri-Pyoverdine zeigt in allen Fällen einen Massenzuwachs von 53 u (= +<sup>56</sup>Fe<sup>3+</sup> – 3H<sup>+</sup>). Außerdem ist in den Spektren der drei freien Verbindungen ein Ion der Masse m/z 1031 zu beobachten, das dem Verlust des Chromophors mit dem



Dieses Werk wurde im Jahr 2013 vom Verlag Zeitschrift für Naturforschung in Zusammenarbeit mit der Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V. digitalisiert und unter folgender Lizenz veröffentlicht: Creative Commons Namensnennung-Keine Bearbeitung 3.0 Deutschland Lizenz.

Zum 01.01.2015 ist eine Anpassung der Lizenzbedingungen (Entfall der Creative Commons Lizenzbedingung „Keine Bearbeitung“) beabsichtigt, um eine Nachnutzung auch im Rahmen zukünftiger wissenschaftlicher Nutzungsformen zu ermöglichen.

This work has been digitized and published in 2013 by Verlag Zeitschrift für Naturforschung in cooperation with the Max Planck Society for the Advancement of Science under a Creative Commons Attribution-NoDerivs 3.0 Germany License.

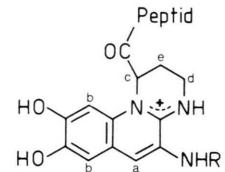
On 01.01.2015 it is planned to change the License Conditions (the removal of the Creative Commons License condition "no derivative works"). This is to allow reuse in the area of future scientific usage.

daran gebundenen Säurerest entspricht [2]. Demzufolge unterscheiden sich C, D und E nur in letzterem.

Zur Analyse der Aminosäuren wurden die Ferri-Pyoverdine mit 6N HI, die Pyoverdine mit 6N HI bzw. HCl 21 Std. bei 110 °C hydrolysiert und die freigesetzten Aminosäuren in ihre N-Trifluoracetyl-*n*-butylester (TAB) übergeführt und durch GC/MS identifiziert [9]. Die quantitative Analyse erfolgte durch GC-Analyse der nach HI-Hydrolyse erhaltenen TAB [10]. Das Ergebnis ist bei allen drei Pyoverdinen dasselbe: 2 Thr, 2 Ser, 2 Orn, 1 Lys und 1 Arg. Aus D und E erhält man zusätzlich 1 Bernsteinsäure. Wichtig ist, daß Hydrolyse mit HCl an Stelle von Orn N(δ)-Hydroxyornithin liefert, das bei Verwendung von HI quantitativ zur Orn reduziert wird [11].

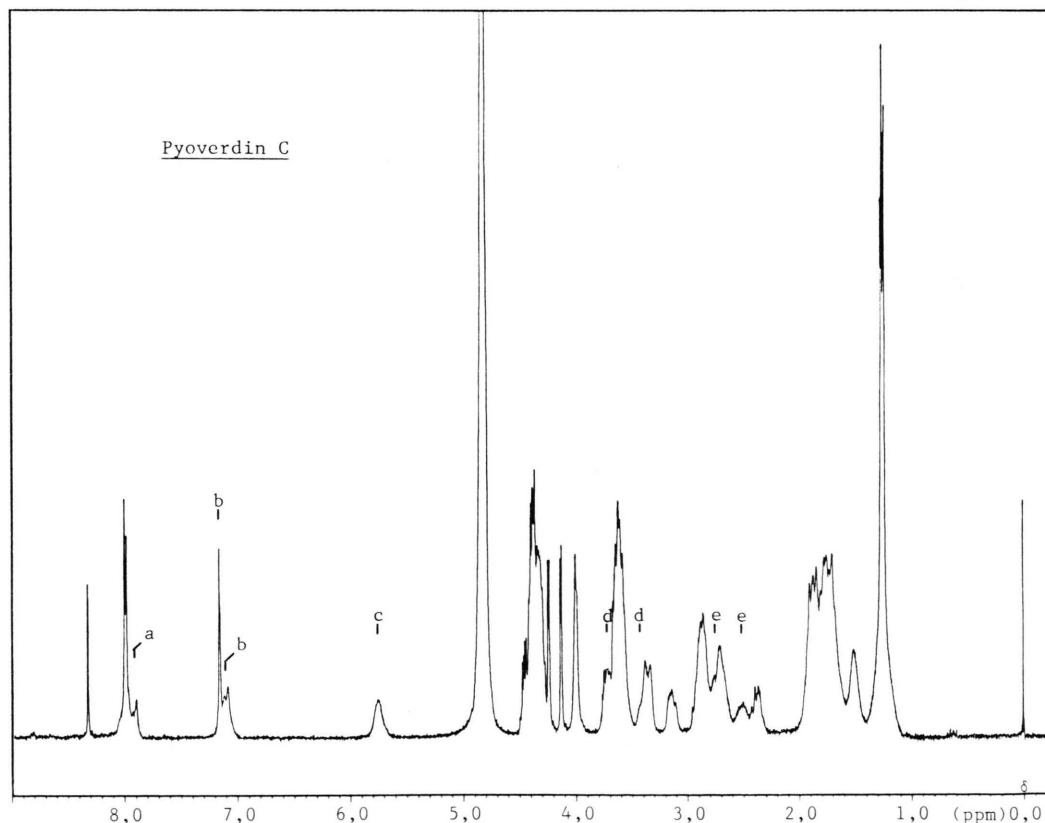
Die 300 MHz <sup>1</sup>H-NMR-Spektren der Pyoverdine C, D und E sind in Abb. 1 wiedergegeben. Die Zuordnung der für den Chromophor (s. Tab. II)

Tab. II. <sup>1</sup>H-NMR-Daten des Chromophors von Pyoverdin C, D und E ( $\delta$  ppm, DSS als interner Standard, Lösungsmittel D<sub>2</sub>O, 294 K).



Proton	Pyoverdin C	Pyoverdin D	Pyoverdin E
a	7,90	7,96	7,96
b	7,08 7,16	7,12 7,25	7,13 7,24
c	5,74	5,77	5,80
d	3,42 3,73	3,43 3,74	3,44 3,75
e	2,49 2,7 <sup>a</sup>	2,49 2,72	2,52 2,72

<sup>a</sup> Wegen Überlappung mit anderen Signalen nicht genau bestimmbar.



1a

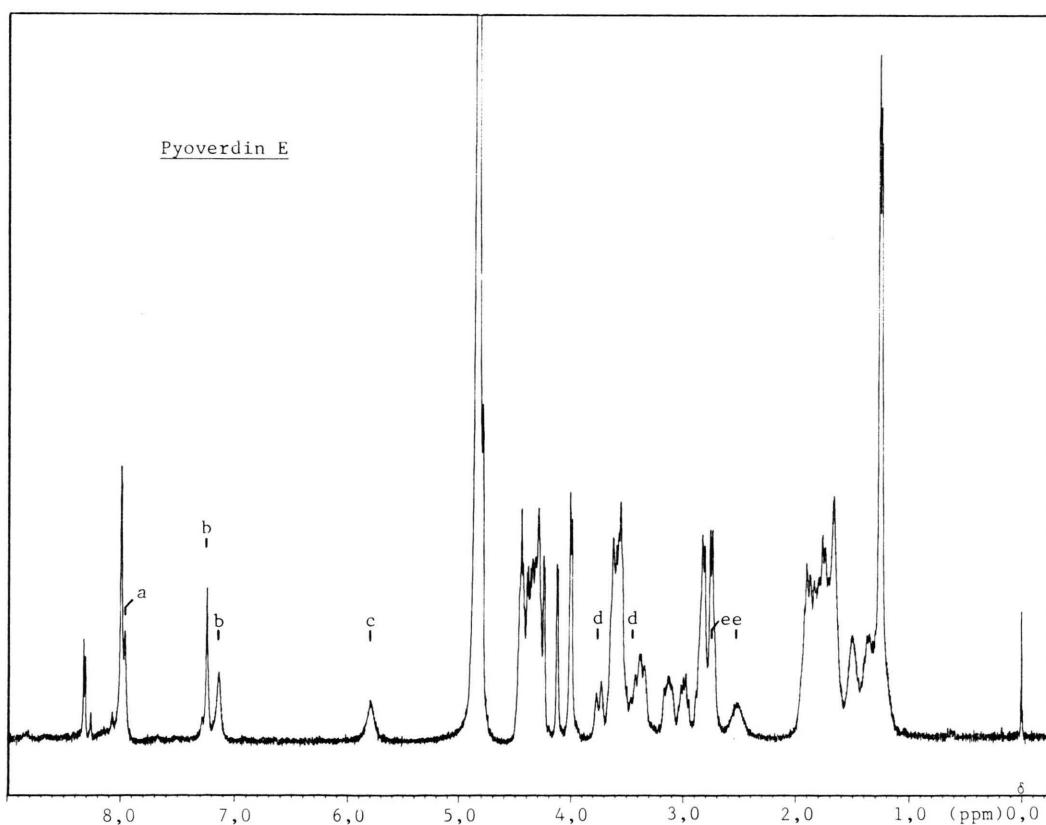
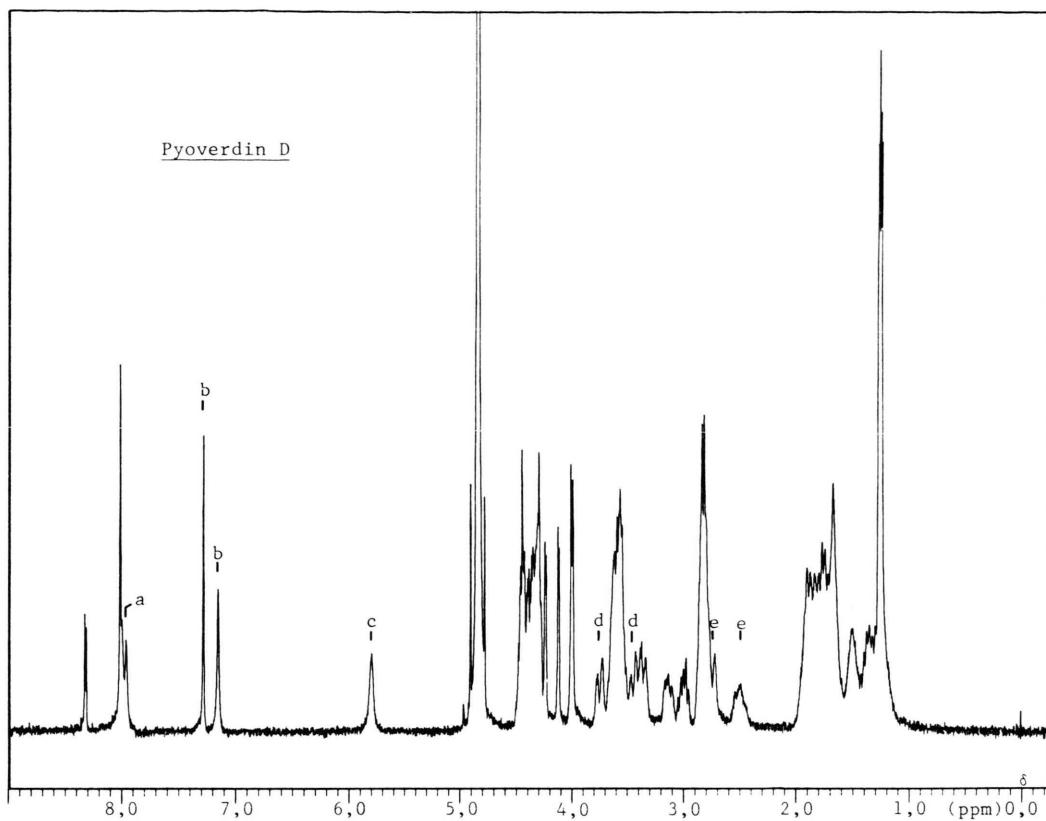
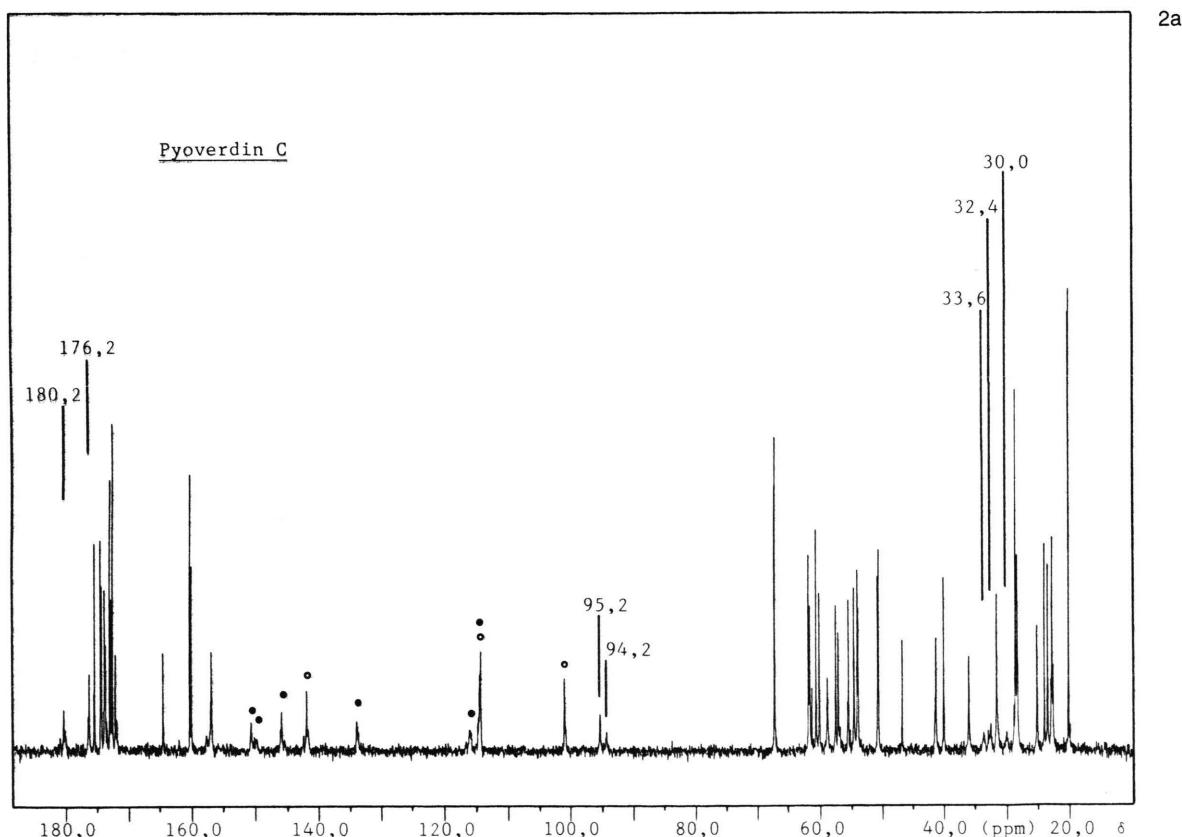


Abb. 1. 300 MHz  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von Pyoverdin C, D und E (experimentelle Angaben s. Tab. II). a–e: s. Formelbild Tab. II.

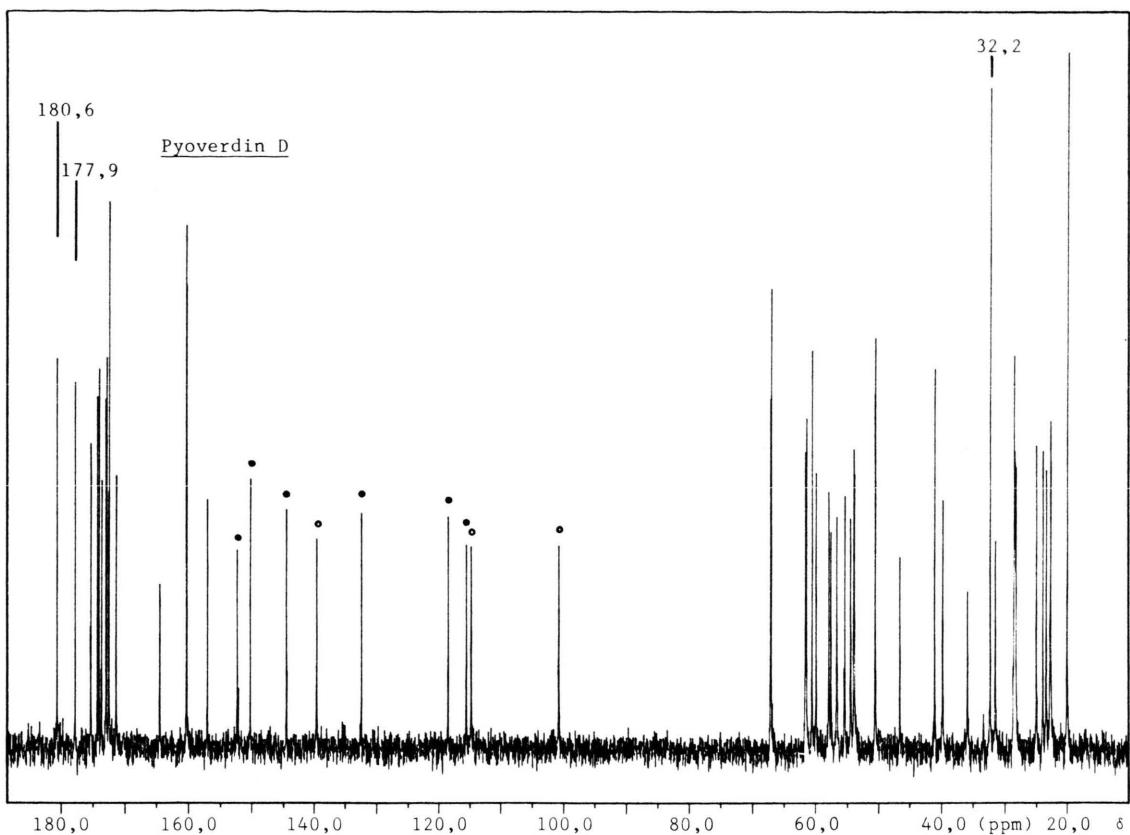
charakteristischen Signale erfolgte durch Vergleich mit Literaturdaten [2, 6, 7, 12], wobei auftretende Kopplungen durch Doppelresonanzexperimente verifiziert wurden. Aus D und E ist bei der Hydrolyse Bernsteinsäure erhalten worden. Die entsprechenden Signale finden sich [2, 6, 7, 12] für E bei 2,74 und 2,81 ppm, für D bei 2,71 und 2,76 ppm. Ansonsten zeigen die Spektren der beiden Verbindungen keine Unterschiede. C, aus dem keine Bernsteinsäure erhalten worden war, zeigt zwischen 2,3 und 2,9 ppm deutliche Abweichungen (s. unten). Alle drei Verbindungen zeigen bei 7,99 und bei 8,33 ppm Resonanzsignale mit einem Intensitätsverhältnis 1:3, die zusammen 2 Protonen ergeben. Jedes dieser Signale besteht aus 2 Singulets. Diese Aufspaltung ist auf die *cis/trans*-Isomerie von Amidgruppierungen bedingt durch die gehinderte Rotation zurückzuführen [4]. Säuert man eine Lösung von C, D oder E in D<sub>2</sub>O mit DCl an (pH 1), so verschwinden nach 2–3 Std. beide Signalgruppen, während ein neues Signal bei

8,22 ppm (freie Ameisensäure) erscheint (vergl. [2, 4]).

In Abb. 2 sind die 75,4 MHz <sup>13</sup>C-NMR-Spektren von C, D und E wiedergegeben. Deutlich sind zwischen 100 und 155 ppm die Signale des Chromophors zu erkennen [7, 12]. Die Signale der beiden Formylgruppen liegen bei 160,3 und 164,5 ppm. Die Aufspaltung von 4,2 ppm kommt wieder (vergl. die <sup>1</sup>H-NMR-Spektren) durch die *cis/trans*-Isomerie zustande. Die <sup>13</sup>C-NMR-Spektren aller drei Verbindungen unterscheiden sich nur durch die Signale, die dem an den Chromophor gebundenen Säurerest zuzuordnen sind. Bei D sind es zwei zusammenfallende CH<sub>2</sub>-Signale bei 32,2 ppm und zwei CO-Signale bei 177,9 und 180,6 ppm, bei E zwei CH<sub>2</sub>-Signale bei 30,5 und 31,4 und zwei Carbonylsignale bei 177,1 und 178,4 ppm, die der bei der Hydrolyse gefundenen Bernsteinsäure zugeordnet werden können. Bezgl. C siehe unten.



2b



2c

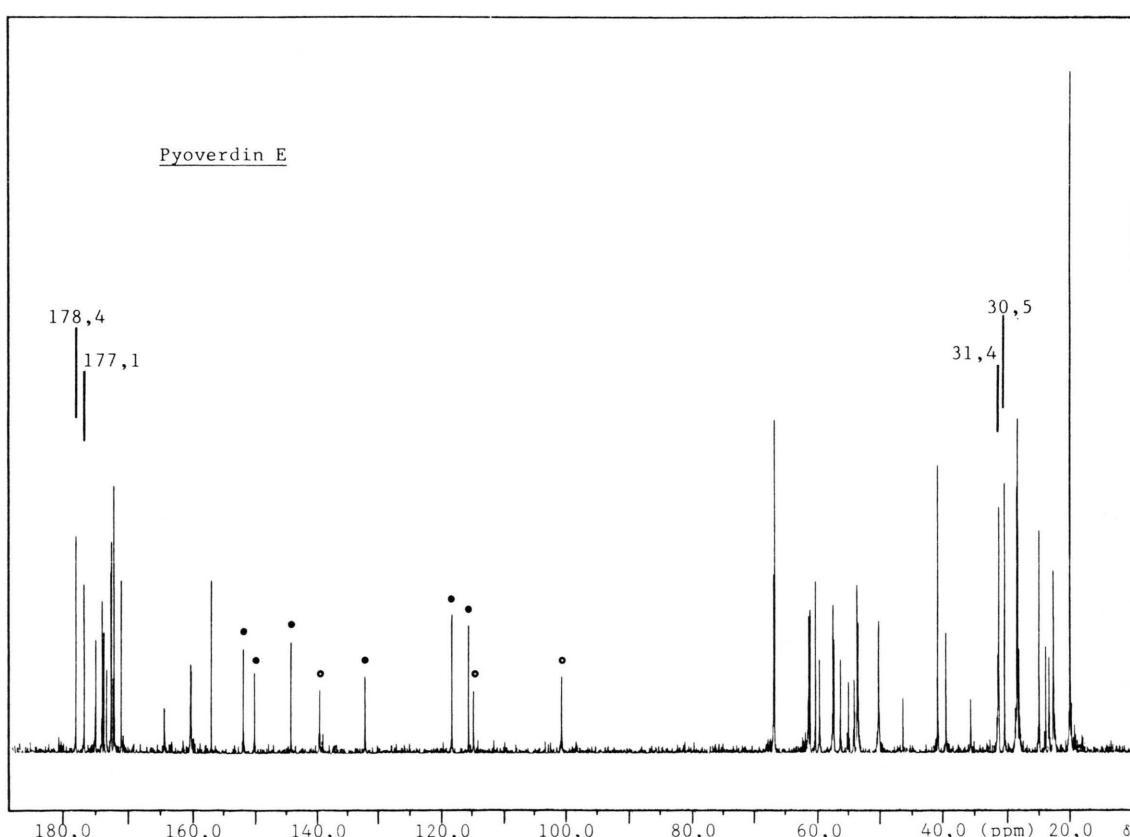


Abb. 2. 75,4 MHz  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von Pyoverdin C, D und E ( $\delta$  ppm, DSS als interner Standard:  $\delta(\text{Si}(\text{CH}_3)_4) = \delta \text{ DSS} - 1,88 \text{ ppm}$ , 295 K, Lösungsmittel:  $\text{D}_2\text{O}$  für D und E, 50 mM Phosphatpuffer, pH 6,8, in 90%  $\text{H}_2\text{O}$  + 10%  $\text{D}_2\text{O}$  für C). ● Aromatische quaternäre C-Atome des Chromophors; ○ aromatische tertiäre C-Atome des Chromophors (bestimmt durch Aufnahme von DEPT- $^{13}\text{C}$ -Spektren); | Säurerest am Chromophor (mit Angabe der chem. Verschiebung).

## Diskussion der Ergebnisse

Nach allen spektralen Daten enthalten Pyoverdin C, D und E den von *Pseudomonas*-Siderophoren her bekannten Chromophor eines protonierten 2,3-Dihydro-8,9-dihydroxy-1H-pyrimido[1,2-a]chinolins (s. Formel in Tab. II). Die Aminosäureanalyse ergibt in allen drei Fällen dieselbe Zusammensetzung wie für Pyoverdin Pa [2] beschrieben. Damit im Einklang steht die Bildung der Fragmente  $m/z$  1031 in den FAB-Massenspektren. Nach den NMR-Daten müssen überdies 2 N-Formylgruppen vorhanden sein.

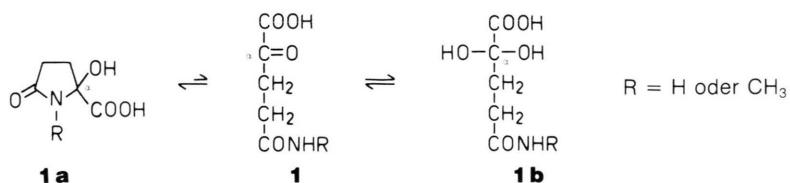
Pyoverdin C, D und E unterscheiden sich demnach nur in dem an den Chromophor gebundenen Säurerest. Aus D und E wird bei der Hydrolyse Bernsteinsäure erhalten; D besitzt jedoch ein um eine Einheit höheres Molekulargewicht. In wässriger Lösung geht E langsam in D über, das, wie das elektrophoretische Verhalten zeigt, eine freie Carboxylgruppe mit einem  $pK_a$ -Wert von etwa 4,5 besitzt. D läßt sich mit  $\text{CH}_3\text{OH}/\text{HCl}$  verestern ( $-\text{COOCH}_3$ ) und anschließend mit  $\text{NaBH}_4$  reduzieren ( $-\text{CH}_2\text{OH}$ ). Nachfolgende Hydrolyse liefert  $\gamma$ -Butyrolacton. Die Bildung von D und E erfolgt somit durch Übergang einer  $\text{CONH}_2$ - in eine  $\text{COOH}$ -Gruppe. Dem entsprechen auch die Veränderungen in den NMR-Spektren (s. o.). Die Lage der beiden  $\text{CH}_2$ -Signale im  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von E entspricht den Literaturwerten für ein analoges Strukturelement [7], während für D Resonanz bei etwas höherem Feld beobachtet wird, wobei die Verschiebung eines der beiden Signale (2,71 ppm) stark pH-abhängig ist ( $\text{CH}_2$  benachbart zur  $\text{COOH}$ -Gruppe). Auch im  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum sind die erwarteten Veränderungen zu beobachten. Pyoverdin D ist somit wahrscheinlich kein genuiner Metabolit sondern erst im Kulturmedium durch Hydrolyse der Succinamidfunktion aus E entstanden.

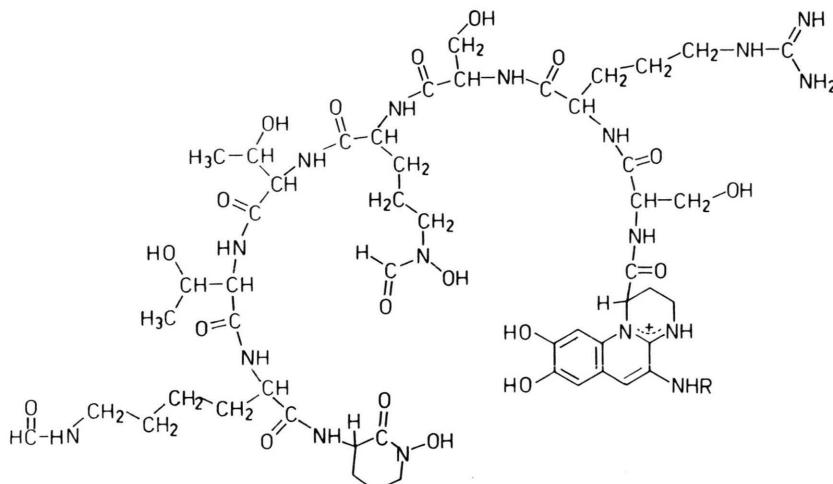
Im Falle von Pyoverdin C konnte bei der Hydrolyse neben den Aminosäuren keine weitere Komponente nachgewiesen werden. Es ist – wie D – bei pH 6,5 positiv geladen – beide  $\text{Fe}^{3+}$ -Komplexe sind neutral –, enthält daher auch eine freie Carboxyl-

gruppe, allerdings mit einem  $pK_a$ -Wert unter 3. C ist um 28 Masseneinheiten schwerer als D. Diese Beobachtungen sprechen für  $\alpha$ -Ketoglutsäure ( $\alpha$ -Ketosäuren zersetzen sich beim Erhitzen in wässrigen Aminosäure-Lösungen [13]). Sie läßt sich indirekt als  $\alpha$ -Hydroxyglutsäure nachweisen, wenn man Ferri-C mit  $\text{NaBH}_4$  reduziert und anschließend mit 6N HCl hydrolysiert (bei Hydrolyse mit HI erhält man das Reduktionsprodukt Glutarsäure). Bei Oxidation mit  $\text{Pb}(\text{OCOCH}_3)_4$  erhält man Bernsteinsäure [14]. Der stark saure Charakter von C legt den Schluß nahe, daß sich die Ketogruppe neben der freien Carboxylgruppe befindet. Dies läßt sich durch Oxidation von Ferri-C mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  [15] bestätigen: Man erhält Ferri-Pyoverdin D. Nach Dekomplexierung unterscheidet sich das erhaltene Produkt nicht von authentischem Pyoverdin D (Aminosäure-Zusammensetzung, FAB-Massenspektrum, NMR-Spektren, chromatographisches Verhalten).

$\alpha$ -Ketoglutsäure als Säurekomponente erklärt auch einige Besonderheiten in den NMR-Spektren von Pyoverdin C. Die  $\text{CH}_2$ -Protonen von  $\alpha$ -Ketoglutsäure sollten eigentlich das Muster eines AA'BB'-Systems zwischen 2,5 und 3,5 ppm bilden. Stattdessen findet man zwischen 2,3 und 2,9 ppm ein kompliziertes Spinsystem, dessen Analyse noch durch das Auftreten zweier weiterer Methylen Signale in diesem Bereich erschwert wird. Zu dem Spinsystem gehört ein Multiplett bei 2,37 ppm, das mit Signalen im Bereich von 2,6 und 2,9 ppm koppelt. Desgleichen sind die Aromatensignale bei 7,08 und 7,90 ppm (s. Abb. 1 und Tab. II) verbreitert und strukturiert. Der Grund hierfür ist, daß  $\alpha$ -Ketoglutsäure und ihre Derivate wie z. B. das Amid **1** im Gleichgewicht mit hydratisierten und cyclischen Formen vorliegen [15–17]:

Das Vorliegen eines Gleichgewichtes bestätigt auch das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum: das für  $\alpha$ -Ketoglutsäure bei  $\sim 200$  ppm zu erwartende [17] Signal für die Ketogruppe ist in  $\text{D}_2\text{O}$ -Lösung nicht zu erkennen. Desgleichen sind die Aromatensignale des Chromophors z. T. stark verbreitert. Am besten interpretierbar ist das  $^{13}\text{C-NMR}$ -Spektrum, wenn eine





2: R = CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CO-COOH

3: R = CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-COOH

4: R = CO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-CONH<sub>2</sub>

Lösung von C in einer gepufferten H<sub>2</sub>O-Lösung (50 mM Phosphatpuffer, pH 6,8) vorliegt. Im Carbonylbereich finden sich nun Signale bei 176,2, 176,3, 180,0 und 180,2 ppm, die dem  $\alpha$ -Ketoglutarsäure-System zuzuordnen sind (Vergleich mit D und E). Im Methylenbereich liegen im Gegensatz zu D und E zwischen 30 und 35 ppm mindestens drei stark verbreiterte Signale geringer Intensität. Zusätzlich treten bei 94,2 und 95,2 ppm zwei ebenfalls verbreiterte Signale auf. In diesem Bereich wären die Signale der  $\alpha$ -C-Atome von **1a** und/oder **1b** und damit auch von **2** zu erwarten. Nach oxidativer Decarboxylierung von C zu D verschwinden alle diese Anomalien.

Pyoverdin C, D und E kommen somit die Strukturen **2**, **3** und **4** zu. Die Ergebnisse unserer Untersuchungen legen nahe, daß Pyoverdin E identisch mit Pyoverdin Pa [2] (gleicher Chromophor mit Succinamid-Seitenkette, gleiche Aminosäurezusammensetzung einschließlich zweier Formylreste, gleiche – so weit in der vorläufigen Mitteilung [2] publiziert – physikalische Daten) in der modifizierten Struktur **4** (die zweite Formylgruppe befindet sich nicht am Ser sondern an der  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lys [18] – dies stimmt mit unseren Beobachtungen überein, daß Ferri-E bei pH 6,5 + 1 geladen ist: bei freier Lys-NH<sub>2</sub>-Gruppe müßte die Ladung + 2 sein; auch die Aufspaltung der Formylsignale im <sup>1</sup>H-NMR-Spektrum spricht für eine Formamid- und nicht für eine Ameisensäureester-Struktur) ist. Pyoverdin D ist ein

Hydrolyseprodukt von E, während C einen neuen Vertreter dieser Reihe darstellt.

#### Dank

Herrn Prof. Dr. G. Pulverer und Herrn Dr. H. Korth, Hygiene-Institut der Universität zu Köln, möchten wir für die Überlassung des Bakterienstamms danken.

## Experimenteller Teil

### Geräte

**Massenspektrometrie:** FAB: MAT 731, ausgerüstet mit FAB-Einrichtung der Firma Ion Tech Ltd., positive Ionen, Xenon, Matrix Glycerin. GC/MS: Finnigan 3200 mit Gaschromatograph 9100, Kapillarsäule BP 1, 25 m

**UV:** Beckman Spektrophotometer 25

**NMR:** Bruker AM 300

**GC:** Carlo Erba Fractovap 4160, Kapillarsäule SE 52 (25 m), Trägergas Helium; Integrator: Shimadzu Chromatopac C-R3A

**HPLC:** Knauer HPLC-Pumpe FR 30 und UV/Vis Filter-Photometer

**Elektrophorese.** CAMAG-Hochspannungs-Elektrophorese-System 60600, Elektrophoresepapier MN 261 der Firma CAMAG

**Chromatographie.** Erzeugung des Gradienten mit einem ULTROGRAD Gradientenmixer LKB 11300 mit Schlauchpumpe Modell 12000 Varioperpex (Fa. LKB, Bromma, Schweden); Detektor: ISCO-UA-5 Absorbance Monitor (Fa. ISCO, Nebraska, USA)

**Bakterienzucht.** *Pseudomonas aeruginosa* wurde in 2-Liter-Kulturen (4,0 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,5 g MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O; 5,0 g (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 13,0 g Natriumgluconat, 5 Tropfen Silikonentschäumer) gezüchtet, die mittels eines Magnetruhrers gerührt und von unten mit keimfreier Luft (2 l/min) durchperlt wurden. Durch Zugabe von konz. HCl zur Kulturlösung wurde ihr pH-Wert während der 4–5tägigen Zucht im Bereich pH 7,0–7,5 gehalten.

**Aufarbeitung.** Nach Abbruch der Kultur wurde das abzentrifugierte Kulturmedium mit 1 g Eisen(III)-citrat pro Liter versetzt, wobei die ursprünglich gelbgrüne Färbung in Rotbraun umschlug, mit halbkonz. HCl auf pH 6,5 gebracht und auf eine mit XAD-4 (0,3–1 mm, Fa. Serva, Heidelberg) gefüllte Säule (6 × 30 cm für 4 l Medium) aufgetragen. Nach Spülen mit Wasser bis das Eluat keine Trübung (Bakterien) mehr zeigte, erfolgte Elution der absorbierten Ferri-Pyoverdine mit ca. 2 l H<sub>2</sub>O/Aceton 8:2 (v/v).

Weitere Fraktionen kann man durch Waschen des Harzes mit 1 l H<sub>2</sub>O/Eisessig 1:1000 (v/v) und anschließend mit 1 Liter Aceton erhalten. Die einzelnen Fraktionen wurden bei Raumtemperatur i.V. zur Trockene eingeengt.

**Chromatographie der Ferri-Pyoverdine.** 0,5–1 g des Ferri-Pyoverdin-Gemisches wurden in 5 ml 0,02 M Pyridinacetat-Puffer (pH 4,7) gelöst und auf eine mit CM-Cellulose MN 2100 (Fa. Macherey & Nagel, Düren) gepackte Säule (C 26/40 der Fa. Pharmacia, Uppsala, Schweden, Gelbett 2,6 × 25 cm), äquilibriert mit dem gleichen Puffer, aufgebracht. Die Chromatographie erfolgte durch folgende lineare Pyridinacetat (pH 4,7)-Gradienten: 0,02 bis 0,2 M (3 Std.), anschließend 0,2 bis 1 M (1 Std.) (lineare Flußrate: 19 cm/Std.). Es wurden 5 Fraktionen aufgefangen: Die erste Fraktion (A, B) bestand aus einer braunen und einer roten Bande, die zweite bis vierte Fraktion enthielt die weiter untersuchten braunen Ferri-Pyoverdine C, D und E, als letzte Fraktion (F, G) zwei graubraune sowie eine rote Bande. Die Ferri-Pyoverdine, C, D und E waren die Hauptkomponenten des Gemisches und wurden anschließend an CM-Sephadex C-25 (Gelbett 2,6 × 30

cm, Fa. Pharmacia) mit entsprechenden linearen Gradienten von 0,02 bis 1 M Pyridinacetat (pH 4,7) rechromatographiert und anschließend an Bio-Gel P-2 (200–400 mesh, Fa. Bio Rad, Californien, USA, Gelbett 2,6 × 60 cm) mit 0,2 M Pyridinacetat (pH 6,5) gelchromatographiert. Die einzelnen Ferri-Pyoverdine wurden sofort bei Raumtemperatur i.V. zur Trockne eingeengt und bei –10 °C unter Argon aufbewahrt.

**Dekomplexierung der Ferri-Pyoverdine** erfolgte durch mehrmaliges Ausschütteln einer wäßrigen Lösung des Eisen(III)-komplexes mit einer 5-prozentigen (m/v) Lösung von 8-Hydroxy-chinolin in Chloroform [5]. Um eine möglichst vollständige Dekomplexierung zu erreichen, ist es nötig, die wäßrige Lösung anzusäuern. Verwendet man dazu statt 10-prozentiger Essigsäure [5] eine 1-prozentige wäßrige Citronensäure-Lösung (pH 2,5), so verläuft die Dekomplexierung schneller und vollständiger, ohne daß eine nennenswerte Zersetzung der Pyoverdine beobachtet wird. Nach Waschen der wäßrigen Phase mit CHCl<sub>3</sub> wird an Bio-Gel P-2 (2,6 × 60 cm) mit 0,2 M Pyridinacetat-Puffer (pH 6,5) chromatographiert. Das gelbe, stark fluoreszierende Pyoverdin wurde nach Einengen der Lösung i.V. zur Trockne bei –10 °C vor Licht geschützt über Argon aufbewahrt. Für spektroskopische Untersuchungen wurden die Pyoverdine in ihre Chloride übergeführt, indem ihre wäßrigen Lösungen über eine kurze Säule gepackt mit DEAE-Sephadex A 25 (Fa. Pharmacia, Chlorid-Form) chromatographiert wurden.

**Chromatographie und Elektrophorese.** **Dünn-schichtchromatographie** der Ferri-Pyoverdine erfolgte an Kieselgel-Folien 60 F 254 (Fa. Merck, Darmstadt) mit Methanol/Wasser 7:3 (v/v) als Laufmittel: R<sub>f</sub>-Werte: 0,06 (C); 0,28 (D); 0,02 (E). Die Substanzen wurden visuell anhand der braunen Farbe oder nach Besprühen mit 1-prozentiger EDTA-Lösung und Beobachten der Fluoreszenz bei Bestrahlen mit UV-Licht (366 nm) identifiziert. Die Pyoverdine und ihre Eisen(III)-komplexe zeigten eine positive Reaktion mit dem Sakaguchi-Reagenz auf Arginin, jedoch keine Reaktion mit Ninhydrin.

**Die Papierelektrophorese** der Pyoverdine und ihrer Eisen(III)-komplexe erfolgte 1 Std. bei 2500 V. Die Wanderungsstrecken werden relativ zu Desferri-Ferrioxamin B (Geschenk Fa. Ciba-Geigy) mit Glucose als Nullpunkt (zur Kompensation der Elektroosmose) angegeben. Verwendet wurden folgende Puffer: pH 1,9; Ameisensäure/Eisessig/Wasser 13:60:500 (v/v/v).

v/v); pH 3: 0,1 n Essigsäure; pH 6,5; 0,1 n Pyridin + Eisessig. Die Bestimmung der Ladungsgröße bei pH 6,5 erfolgte nach der Methode von Offord [8] mit Pyridin/Eisessig/Wasser 25:1:225 (v/v/v) (Dauer 45 min bei 2500 V). Bezogen auf Asparaginsäure ergab sich für Ferri-Pyoverdin E eine Mobilität von  $m=0,21$ . HPLC der Ferri-Pyoverdine erfolgte an einer mit Nucleosil 5 C<sub>18</sub> (Macherey & Nagel) ge- packten Säule (4,6 × 250 mm) (Flow 1 ml/min). Mit dem Laufmittel 0,1 n Ammoniumacetat (pH 7,0)/ Methanol 85:15 (v/v) erhielt man folgende Retentionszeiten: Ferri-C: ca. 10,5 min, starkes Tailing, Ferri-D: 6,5 min, Ferri-E: 9,7 min. Mit dem Laufmittel 0,1-prozentige Trifluoressigsäure + NH<sub>3</sub> (pH 2,2)/Methanol 85:15 erhielt man folgende Retentionszeiten: Ferri-C: 8,2 min, Ferri-D: 9,6 min, Ferri-E: 7,1 min.

**Aminosäureanalyse.** Die Totalhydrolyse der Pyoverdine und ihrer Eisen(III)-komplexe erfolgte mit 1–2 mg Substanz in einem Pyrex-Glasröhren (10 × 100 mm) mit Teflon-Schraubkappe in 6 n HCl oder 6 n HI unter Argon bei 110 °C für 21 Std. Vor der Hydrolyse der Eisen(III)-komplexe mit 6 n HCl wurden die Eisenionen durch mehrmaliges Ausschütteln der salzauren Lösung mit Ether entfernt, um die Zersetzung des N(δ)-Hydroxyornithins zu vermeiden. Die qualitative Analyse des Hydrolysat erfolgte nach Derivatisierung zu den TAB-Derivaten über GC/MS (Temperaturprogramm 120–230 °C; 10 °C/min). Die quantitative Analyse wurde gleichfalls gaschromatographisch mit dem HI-Hydrolysat durchgeführt. Dazu wurde dieses vor Überführung in die TAB-Derivate mit 1 ml einer 1,00 mM wäßrigen Lösung von Norleucin (innerer Standard) versetzt. Zur Bestimmung der Korrekturfaktoren wurden Testmischungen bestehend aus den 5 Aminosäuren, Bernsteinsäure und Norleucin bekannter Zusammensetzung derivatisiert und analysiert (Temperaturprogramm 80–230 °C; 5 °C/min, Injektor- und Detektor (FID)- Temp.: 260 °C; Split ca. 1:20.

Zur Überführung in die N-Trifluoracetyl-n-butyl-ester (TAB)-Derivate wurde das Hydrolysat bei 50 °C i.V. im Pyrex-Glasröhren zur Trockne eingeengt und 30 min i.V. getrocknet, der Rückstand mit 1 ml einer 10-prozentigen Lösung von Acetylchlorid in n-Butanol versetzt, 1 min Ultraschall ausgesetzt und 20 min im verschlossenen Pyrex-Röhren auf 100 °C erhitzt. Nach Einengen bei 50 °C i.V. zur Trockne wurde zweimal mit jeweils 0,1 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt und erneut eingeengt, der Rückstand nach

15-minütigem Trocknen i.V. bei Raumtemperatur mit 1 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> versetzt, 30 sec Ultraschall ausgesetzt und nach Zugabe von 0,3 ml Trifluoressigsäure-anhydrid 5 Minuten im verschlossenen Pyrex-Röhren bei 150 °C acyliert. Das Reaktionsröhren blieb verschlossen und wurde bis zur gaschromatographischen Analyse bei –10 °C aufbewahrt.

**Veresterung und Reduktion von Ferri-Pyoverdin D.** 2 mg Ferri-Pyoverdin D wurden in 2 ml 0,05 n HCl/CH<sub>3</sub>OH gelöst und 3 Std. bei 4 °C verestert, die Lösung i.V. zur Trockne eingeengt und der Rückstand in 3 ml CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 1:1 (v/v) gelöst. Nach Zugabe von 15 mg NaBH<sub>4</sub> blieb die Lösung 2 Tage bei Raumtemperatur stehen. Nach Einengen i.V. zur Trockne wurde der Rückstand in 2 ml 6 n HCl gelöst, durch mehrmalige Etherextraktion von Eisen(III)-ionen befreit und anschließend für 21 Std. bei 110 °C unter Argon hydrolysiert. Nach Extraktion mit CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (5 × 2 ml) wurden die vereinigten organischen Phasen im Stickstoffstrom auf ca. 0,1 ml eingeengt und gaschromatographisch analysiert, und zwar (a) mit GC/MS (Temperaturprogramm 80–230 °C, 8 °C/min). Massenspektrum:  $m/z$  (el. Int.) 86 (70): M<sup>+</sup>; 56 (25); 42 (100); 41 (60); Retentionszeit und Massenspektrum sind identisch mit denen von authentischem γ-Butyrolacton. (b) GC (60 °C isotherm, Trägergasdruck 0,3 kg/cm<sup>2</sup>). Retentionszeit 4,90 min, identisch mit der von γ-Butyrolacton.

**Reduktion von Ferri-Pyoverdin C mit NaBH<sub>4</sub>.** 2 mg Ferri-Pyoverdin C wurden in 3 ml CH<sub>3</sub>OH/H<sub>2</sub>O 10:1 (v/v) gelöst, mit 10 mg NaBH<sub>4</sub> versetzt und 3 Tage bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Einengen i.V. zur Trockne wurde der Rückstand entweder in 2 ml 6 n HCl gelöst, durch mehrmalige Etherextraktion von Eisen(III)-ionen befreit und anschließend bei 110 °C unter Argon 21 Std. hydrolysiert, oder aber in 6 n HI gelöst und direkt in gleicher Weise hydrolysiert. Derivatisierung des Hydrolysat und anschließende gaschromatographische Analyse erfolgte wie bei der Aminosäureanalyse. Neben den auch bei der Hydrolyse von Pyoverdin C erhaltenen Aminosäure-Derivaten (s. Text) wurde zusätzlich 1 Äquivalent eines weiteren Derivates detektiert: Im Falle der HCl-Hydrolyse handelt es sich um O-Trifluoracetyl-α-hydroxy-glutarsäure-dibutylester.

Massenspektrum:  $m/z$  (Rel. Int.) 283 (10): [M – OC<sub>4</sub>H<sub>9</sub>]<sup>+</sup>; 227 (50): [m/z 283 – C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>]<sup>+</sup>; 199 (10); 85 (100); 57 (70); 56 (60); 41 (60). Bei der

reduktiven Hydrolyse mit HI erhält man dagegen Glutarsäuredibutylester.

Massenspektrum:  $m/z$  (Rel. Int.) 171 (20);  $[M - 'OC_4H_9]^+$ ; 142 (10); 115 (100)  $[m/z$  171 –  $C_4H_8]^+$ ; 87 (20); 86 (15); 57 (10); 56 (10).

Retentionenzeiten und Massenspektren stimmen mit denen authentischer Verbindungen überein.

#### *Oxidative Decarboxylierung von Ferri-Pyoverdin-C*

(a) Mit Blei(IV)-acetat. 5 mg Ferri-Pyoverdin C wurden in 10 ml 0,1 N Essigsäure gelöst, mit 10 mg fein pulverisiertem Blei(IV)-acetat versetzt und über Nacht gerührt. Die nur noch schwach braun gefärbte Lösung wurde auf eine mit XAD-4 gepackte Säule ( $1 \times 3$  cm) aufgetragen, das Harz mit Wasser gewaschen und das adsorbierte Decarboxylierungsprodukt mit 0,1 N Essigsäure/CH<sub>3</sub>OH 1:1 (v/v) eluiert. Nach Gelchromatographie an Bio-Gel P-2 (Laufmittel: 0,2 N Pyridinacetat, pH 6,5) wurde mit 6 N HI

wie bei der Aminosäureanalyse beschrieben hydrolysiert, derivatisiert und gaschromatographisch analysiert. Zusätzlich zu den schon dort für C beschriebenen Aminosäure-Derivaten wurde nun wie bei den Pyoverdinen D und E auch Bernsteinsäure gefunden.

(b) Mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> · 30 mg Ferri-Pyoverdin C wurden in 35 ml 10-prozentigem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gelöst und mit 40 ml 0,01 N KOH versetzt. Nach Stehen über Nacht wurde die Lösung mit 0,1 N Essigsäure auf pH 5 eingestellt und auf eine mit XAD-4 gepackte Säule (1,5 × 5 cm) aufgebracht. Nach Waschen mit Wasser wurde mit 0,1 N Essigsäure/CH<sub>3</sub>OH 1:1 (v/v) eluiert. Nach Chromatographie des Decarboxylierungsproduktes an CM-Sephadex (linearer Gradient 0,02 bis 0,2 M Pyridinacetat, Gelbett 0,9 × 15 cm) zur Entfernung geringer Mengen am Ausgangsprodukt wurde das erhaltene Produkt wie oben beschrieben dekomplexiert und in die Chlorid-Form umgewandelt. Auf diese Weise erhielt man 17 mg Pyoverdin D.

- [1] Teil XXVIII der Reihe „Bakterieninhaltsstoffe“. Für Teil XXVII s. U. Hildebrand, K. Taraz und H. Budzikiewicz. *Z. Naturforsch.* **40b**, 1563 (1985).
- [2] S. Wendenbaum, P. Demange, A. Dell, J. M. Meyer und M. A. Abdallah, *Tetrahedron Lett.* **24**, 4877 (1983).
- [3] C. C. Yang und J. Leong, *Biochemistry* **23**, 3534 (1984).
- [4] S. B. Philson und M. Llinas, *J. Biol. Chem.* **257**, 8081 und 8086 (1982).
- [5] J. M. Meyer und M. A. Abdallah, *J. Gen. Microbiol.* **107**, 319 (1978).
- [6] M. Teintze, M. B. Hossain, C. L. Barnes, J. Leong und D. van der Helm, *Biochemistry* **20**, 6446 (1981).
- [7] M. Teintze und J. Leong, *Biochemistry* **20**, 6457 (1981).
- [8] R. E. Offord, *Nature* **211**, 591 (1966).
- [9] K. R. Leimer, R. H. Rice und C. W. Gehrke, *J. Chromatogr.* **141**, 121 (1977).
- [10] F. E. Kaiser, C. W. Gehrke, R. W. Zumwalt und K. C. Kuo, *J. Chromatogr.* **94**, 113 (1974).
- [11] T. Emery und J. B. Neilands, *J. Am. Chem. Soc.* **83**, 1626 (1961).
- [12] J. C. McDonald und G. G. Bishop, *Biochem. Biophys. Acta* **800**, 11 (1984).
- [13] A. J. L. Cooper, J. Z. Ginos und A. Meister, *Chem. Rev.* **83**, 321 (1983).
- [14] E. Baer, *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 1597 (1940).
- [15] A. Meister, *J. Biol. Chem.* **200**, 571 (1953).
- [16] A. J. L. Cooper und A. G. Redfield, *J. Biol. Chem.* **250**, 527 (1975).
- [17] T. S. Visvanathan, R. E. Johnson und H. F. Fisher, *Biochemistry* **21**, 339 (1982).
- [18] P. Demange, S. Wendenbaum, A. Bateman, A. Dell, J. M. Meyer und M. A. Abdallah, vorgetragen beim First International Symposium of Ion Transport-Storage-Metabolism, Tübingen, 10.–12. Juli 1985.